



Xu, Bingxin; Zhao, Zichen; Xiaohong Wu

Published in:
Journal of Anhui Agricultural University

Publication date:
2013

Document license:
[Ikke-specificeret](#)

Citation for published version (APA):
Xu, B., Zhao, Z., & Xiaohong Wu (2013). . *Journal of Anhui Agricultural University*, 41(6), 9-12.

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/318817862>



Article · January 2013

CITATIONS
0

READS
23

1 author:



[Zichen Zhao](#)
University of Copenhagen
4 PUBLICATIONS 0 CITATIONS

SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



photo-oxidation mechanism of protein [View project](#)

胃蛋白酶水解松仁蛋白的研究

徐冰心,刘敏,林秀芳,赵梓辰,高小棠,吴晓红* (东北林业大学 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要 [目的]优化得到胃蛋白酶水解松仁蛋白的酶解工艺,并检验水解蛋白清除自由基的效果。[方法]选用胃蛋白酶水解松仁蛋白,并进行酶解工艺优化,同时检测了松仁蛋白胃蛋白酶水解物的还原能力和清除羟基自由基的效果。以可溶性蛋白质量浓度为响应值,进行了单因素及正交试验。[结果]确定了胃蛋白酶水解松仁蛋白的最佳水解条件:酶添加量 7.5 U/g 干蛋白质、水解温度 50 ℃、水解时间 3.75 h、pH 2.0,各因素对结果的影响程度大小依次为 pH、水解时间、酶添加量、温度。抗氧化试验表明,松仁蛋白胃蛋白酶水解物具有清除羟基自由基的能力和还原能力。[结论]研究可为松仁的精深开发利用提供参考依据。

关键词 胃蛋白酶;松仁分离蛋白;酶解条件

中图分类号 S664.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)06-02672-03

Pepsin Hydrolysis of Pine Seed Protein Powder

XU Bing-xin et al (Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract [Objective] To optimize enzyme hydrolyzing conditions for pine nut protein by pepsin, and test free radical scavenging effect of hydrolyzed protein. [Method] By using pepsin to hydrolyze the pine nut protein in order to improve the hydrolysis process. At the same time, the hydrolysates' effect on hydroxyl radical scavenging and reducing power were detected. The mass concentration of the soluble protein was used as the response to conduct single factor experiment and orthogonal experiment. [Result] The optimum conditions of the pine nuts protein hydrolyzed by pepsin were as follows: enzyme concentration 7.5 U per gram of substratum, hydrolyzing temperature 50 ℃, hydrolyzing time 3.75 h, pH 2.0. The influencing factors' order pH > hydrolysis time > adding amount of pepsin > temperature. The antioxidant experiments showed that the enzymatic hydrolysis of the pine nut protein hydrolyzed by pepsin has the capacity of radical scavenging and reducing power. [Conclusion] The study can provide reference basis for utilization and development of pine nut in depth.

Key words Pepsin; Pine nut protein; Enzyme hydrolyzing conditions

红松种仁中含有丰富的优质蛋白质,可提供人体所必需的 8 种氨基酸以及多种维生素和矿物质^[1],具有一定的降血脂^[2]、抗疲劳、提高免疫力^[3]的作用。随着对红松资源的保护、合理地开发利用以及人工育种的发展,已经形成了稳定的原始和人工红松林,解决了松籽资源问题。目前松籽作为一种美味且具有一定保健功能的天然食品,是非常值得深入开发的一种功能性食品。碱性蛋白酶水解松仁蛋白可以得到具有抗氧化功能的蛋白肽^[4],另有报道称胃蛋白酶酶解米糠蛋白可以获得发泡粉^[5],胃蛋白酶酶解大米蛋白有效地改善了大米蛋白的溶解性^[6],选择胃蛋白酶酶解松仁蛋白的研究有一定的意义,并且有关胃蛋白酶水解松仁蛋白的研究尚未见到报道。

笔者旨在通过胃蛋白酶水解松仁蛋白,得到胃蛋白酶水解松仁蛋白的酶解工艺,并检验水解蛋白清除自由基的效果,使得松仁蛋白不仅适宜人体有关蛋白质的营养吸收,同时也可作为蛋白类功能性食品的优良配料,扩大松仁的精深开发利用。

1 材料与方法

1.1 材料 松仁蛋白粉,自制。主要试剂:胃蛋白酶(pepsin,1.5 AU/G),盐酸(质量分数 36%,分析纯),氢氧化钠(分析纯)。主要仪器:AB204-S 电子天平,瑞士梅特勒公司;PHS-2C 型精密酸度计,上海雷磁仪器厂;LXJ-II 型离心分离器,上海医用分析仪器厂;LOC-4M 冷冻干燥机,北京医博康

实验仪器有限公司;SF-100 型粉碎机,上海中药机械制造厂。

1.2 方法

1.2.1 酶解反应。工艺流程:松仁蛋白→胃蛋白酶水解→灭酶→测上清液蛋白质量浓度→调 pH 至 7.0→透析→冷冻干燥。

水解试验,主要考虑酶添加量(1.5、3.0、4.5、6.0、7.5、9.0 U/g 干蛋白质)、水解时间(2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5 h)、水解温度(25、30、35、40、45、50 ℃)以及 pH(1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5)对可溶性蛋白质质量浓度的影响,并据此设计单因素试验和正交试验。一个酶活力单位定义为:1 U 酶 25 ℃条件下 1 min 转化 1 μmol 底物所需的酶量。

1.2.2 蛋白质质量浓度的测定。采用波长 260 及 280 nm 吸收差法^[7]。计算公式如下:

$$\text{蛋白质质量浓度}(\text{mg/ml}) = 1.5 \times A_{280} - 0.75 \times A_{260}$$

式中 A_{260} 为蛋白质溶液在 260 nm 波长处测得的吸光度; A_{280} 为蛋白质溶液在 280 nm 波长处测得的吸光度。

1.2.3 松仁蛋白胃蛋白酶酶解物的羟基自由基清除能力测定。利用 H_2O_2 与 Fe^{2+} 混合产生 $\cdot\text{OH}$,但由于 $\cdot\text{OH}$ 具有很高的反应活性,存活时间短,若在体系中加入水杨酸,就能有效地捕捉 $\cdot\text{OH}$,并产生有色产物,该产物在波长 510 nm 处有强吸收,若在反应体系中加入具有清除 $\cdot\text{OH}$ 功能的被测物,便会与水杨酸竞争 $\cdot\text{OH}$,而使有色产物生成量减少。

采用固定反应时间法,在相同体积的反应体系(8.8 mmol/L H_2O_2 1 ml、9 mmol/L Fe^{2+} 1 ml、9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液 1 ml)中加入一系列不同浓度的提取物 1 ml,最后加 H_2O_2 启动,73 ℃反应 0.5 h。便会与水杨酸竞争 $\cdot\text{OH}$,而使有色产物生成量减少。以蒸馏水为参比,在波长 510 nm 处测量各浓度下的吸光度,考虑到样品本身的吸光值,以

基金项目 东北林业大学大学生创新创业训练计划项目(201210225012);黑龙江省博士后研究项目(LBH-Z11269);中央高校基本科研业务经费专项(DL11BA13)。

作者简介 徐冰心(1991-),女,浙江温岭人,本科生,专业:食品科学与工程专业。* 通讯作者,博士后,E-mail:wxhd1923@126.com。

收稿日期 2013-01-24

9 mmol/L Fe^{2+} 1 ml、9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液 1 ml、不同浓度的提取物 1 ml 和 1 ml 蒸馏水作为样品的本底吸收值。按照下式计算自由基清除率。

清除率 = $100 \times [A_0 - (A_x - A_{x_0})] / A_0$

式中 A_0 空白对照液的吸光度; A_x 加入样品溶液后的吸光度; A_{x_0} 不加显色剂 H_2O_2 样品溶液的吸光度。

1.2.4 松仁蛋白胃蛋白酶酶解物的还原能力。在 1 ml 各浓度样品(空白用 1 ml 蒸馏水代替,其他试剂依次同下)中,加入 2.5 ml 质量分数为 1% 的铁氰化钾溶液和 2.5 ml 的磷酸盐缓冲液(pH 6.6 0.2 mol/L),混匀后在 50 ℃保温 20 min,然后加入 2.5 ml 质量分数为 10% 的三氯乙酸,混合后以 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液 2.5 ml,加入 2.5 ml 蒸馏水和 0.5 ml 质量分数为 0.1% 的 FeCl_3 ,混合均匀,静置 10 min 后,测定波长 700 nm 处吸光度值。

2 结果与分析

2.1 胃蛋白酶水解松仁蛋白的单因素试验结果

2.1.1 酶添加量对溶解性效果的影响。图 1 表明,随着酶添加量增加,上清液中的可溶性蛋白质质量浓度逐渐增加。到 6.0 U/g 干蛋白质,蛋白质得率增长减缓,可溶性蛋白质浓度最高是 0.59 mg/ml。

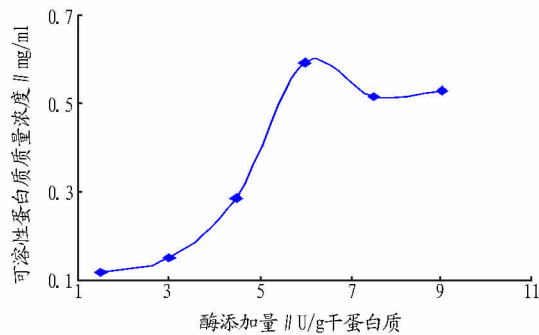


图 1 酶添加量对松仁蛋白水解效果的影响

2.1.2 水解时间对水解效果的影响。由图 2 可见,水解时间 3.5 h 松仁蛋白的溶出量较为理想。在 3.5 h 之后,随着反应时间的延长,可溶性蛋白质的质量浓度增长减缓,并在 4.0 h 后开始下降,下降的原因可能由于松仁蛋白中混有核酸,大量核酸的释放,导致波长 260 nm 下的吸光值变大,继而影响松仁蛋白释放量的检测。

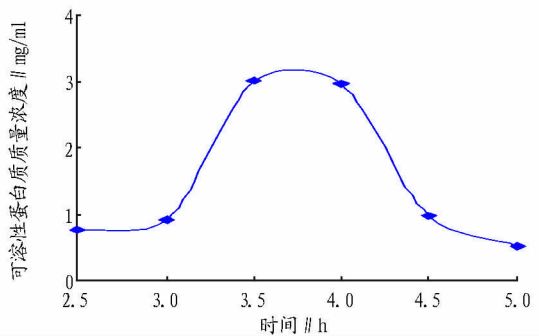


图 2 水解时间对松仁蛋白水解效果的影响

2.1.3 温度对水解效果的影响。图 3 表明,从 25 ~ 45 ℃,可

溶性蛋白质质量浓度随着温度的上升而上升;温度超过 45 ℃时,质量浓度下降。因此 45 ℃是适宜的水解温度。

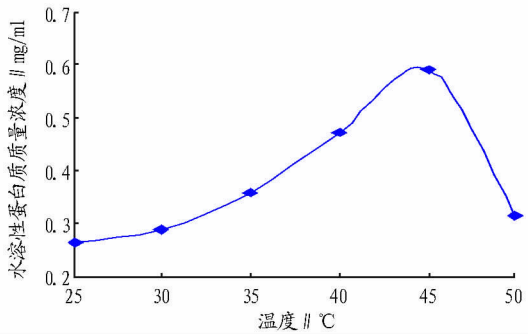


图 3 温度对松仁蛋白水解效果的影响

2.1.4 pH 对水解效果的影响。图 4 表明,在 pH 1.0 ~ 2.5 范围内,随着 pH 的升高,水解液中可溶性蛋白质的质量浓度降低,pH 2.5 时,可溶性蛋白质质量浓度最高,达到 0.37 mg/ml 的含量,说明 pH 2.5 是适宜的水解酸碱度。

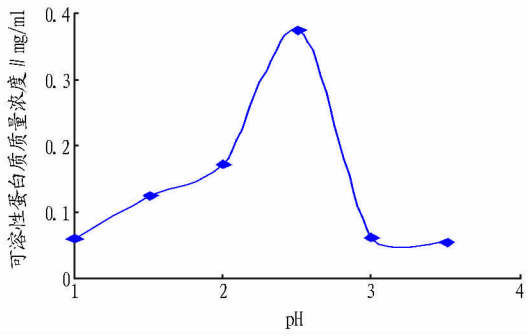


图 4 pH 对松仁蛋白水解效果的影响

2.2 胃蛋白酶水解松仁蛋白的参数优化由单因素试验结果,确定正交试验中酶添加量为 4.5、6.0、7.5 U/g 干蛋白质;水解温度为 40、45、50 ℃;水解时间 3.5、3.75、4 h; pH 为 2.0、2.5、3.0。设计 $L_9(3^4)$ 正交试验(表 1),研究胃蛋白酶对松仁蛋白酶解的最佳工艺参数。

表 1 胃蛋白酶水解松仁蛋白的正交试验因素水平设计

水平	因素			
	酶添加量(A)	pH(B)	水解温度(C)	水解时间(D)
	U/g 干蛋白质		℃	h
1	4.5	2.0	40	3.50
2	6.0	2.5	45	3.75
3	7.5	3.0	50	4.00

表 2 的正交试验直观分析结果表明,对胃蛋白酶对松仁蛋白溶解性的改善影响因素依次为 pH > 水解时间 > 酶添加量 > 水解温度。正交试验的最优条件是 $A_1B_1C_3D_2$,即酶添加量 4.5 U/g 干蛋白质、水解温度 50 ℃、水解时间 3.75 h、pH 2.0。但正交试验组合中的最优条件为 $A_3B_1C_3D_2$,经验证试验得出,最终的优化条件为 $A_3B_1C_3D_2$,即酶添加量 7.5 U/g 干蛋白质、水解温度 50 ℃、水解时间 3.75 h、pH 2.0。

2.3 松仁蛋白酶解物清除羟基自由基的作用从图 5 中可以看出,随着浓度的增大,松仁蛋白胃蛋白酶酶解物对羟基自由基的清除能力增大,在 0.35 mg/ml 时清除率达 85%。

在整个浓度范围内, 松仁蛋白胃蛋白酶酶解物浓度与清除羟基自由基比率间成剂量效应关系。

表2 胃蛋白酶水解松仁蛋白正交试验结果

试验号	因素				蛋白质 量浓度
	酶添加量	pH	温度	时间	mg/ml
1	1	1	1	1	0.851 250
2	1	2	2	2	0.811 000
3	1	3	3	3	0.322 250
4	2	1	2	3	0.718 500
5	2	2	3	1	0.559 750
6	2	3	1	2	0.325 500
7	3	1	3	2	1.005 250
8	3	2	1	3	0.635 000
9	3	3	2	1	0.315 375
K_1	1.984 500	2.575 000	1.811 750	1.726 375	
K_2	1.603 750	2.005 750	1.844 875	2.141 750	
K_3	1.955 625	0.963 125	1.887 250	1.675 750	
R	0.126 916 667	0.537 291 667	0.025 166 667	0.155 333 333	

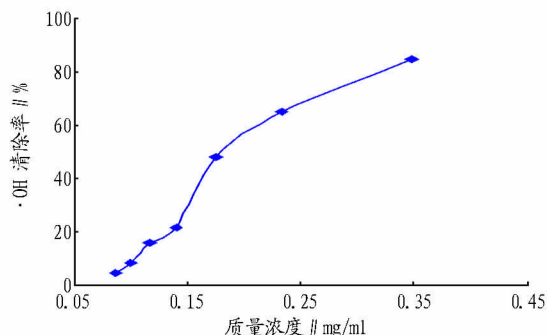


图5 松仁蛋白胃蛋白酶酶解物对羟基自由基的清除能力

2.4 松仁蛋白酶解物还原能力 在 $\text{Fe}^{3+} \cdot \text{Fe}^{2+}$ 反应体系中, 700 nm 波长处的吸光度越大, 表明还原能力越强。由图6可见, 松仁蛋白胃蛋白酶酶解物还原能力较强, 且还原能力随着质量浓度的增大而升高, 呈较好的线性关系。当质量浓度为 0.07 mg/ml 时, 吸光值 0.21; 当质量浓度 0.70 mg/ml 时, 吸光值 0.47。说明松仁蛋白胃蛋白酶酶解物具有还原能力。

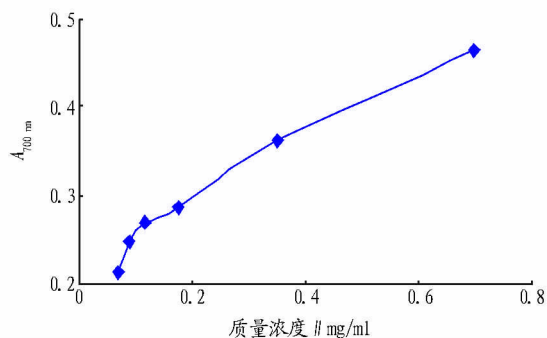


图6 松仁蛋白胃蛋白酶酶解物还原能力的测定

3 结论

试验以可溶性蛋白质质量浓度为考核指标, 采用单因素和正交试验优化了胃蛋白酶酶解松仁蛋白的工艺条件: 酶添加量 7.5 U/g 干蛋白质、水解温度 50 °C、水解时间 3.75 h、pH 2.0, 其中各关键因素中 pH 影响最大, 其次是水解时间、酶添加量和温度。体外抗氧化试验结果表明, 松仁蛋白胃蛋白酶酶解物对羟基自由基有一定的清除能力, 并具备还原能力。试验的结果显示, 松仁蛋白胃蛋白酶酶解物的溶解性优于松仁蛋白, 并具有一定的抗氧化功能, 是值得进行深入研究的蛋白来源。随着对松仁蛋白的深入研究和应用, 在植物蛋白领域, 松仁蛋白会有更广泛的应用, 并成为人们养颜保健佳品。

参考文献

- [1] 吴晓红, 王振宇, 郑洪亮, 等. 红松仁蛋白氨基酸组成分析及营养评价[J]. 食品工业科技, 2011, 32(1): 267-270.
- [2] 杨立宾. 红松种子蛋白提取与生理功能研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2008: 22-29.
- [3] 杨丽娜. 红松松仁分离蛋白的制备及降血脂功能研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2009: 29-47.
- [4] 葛馨, 王振宇. 红松仁抗氧化肽的制备及体外抗氧化活性评价[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(7): 78-82.
- [5] 胡中泽. 酶法水解制取大米蛋白发泡粉工艺参数的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2002(9): 45-46.
- [6] 易翠平, 周素梅, 潘艳艳. 胃蛋白酶水解大米蛋白的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(10): 129-132.
- [7] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

(上接第2644页)

作用, 侧向径流平缓而稳定, 地下水回升相对缓慢。因此, 6 月后浅层与深层地下水位相关性减弱。

3 结论

(1) 太行山前平原浅层地下水位呈逐年下降趋势, 1953~1969 年间年均降幅为 0.15 m; 1970~1979 年间为 0.37 m; 1980 年以来为 0.83 m。现浅层地下水位达 46.9 m。

(2) 地下水位在年内变化具有相同的趋势, 均在 3 月左右出现年内最高水位, 而在 7 月左右出现年内最低水位, 具有明显的年周期特性。但地下水开采量大于其可采资源量, 水位恢复不到年开采前, 总体仍呈不断下降趋势。

(3) 大气降水入渗补给浅层地下水存在明显滞后; 深层地下水对浅层地下水存在顶托越流补给, 3~6 月水位相关系

数达 0.99, 同样处于消耗状态。

(4) 农业用水是研究区的用水大户, 只有采取有效的农业节水措施, 改变目前在研究区内普遍存在的大水漫灌方式, 减少灌溉定额及灌溉水的输水损失, 才能从根本上解决研究区的水资源压力, 缓解地下水资源的持续下降。

参考文献

- [1] 张光辉, 王金哲. 海河流域中东部平原区深层地下水补给与释水机制探讨—兼谈深层地下水资源可利用性[J]. 水文, 2001, 22(3): 5-9.
- [2] 费宇红, 张兆吉, 张凤娥, 等. 华北平原地下水位动态变化影响因素分析[J]. 河海大学学报: 自然科学版, 2005, 33(5): 538-541.
- [3] 张兆吉, 雒国中, 王昭, 等. 华北平原地下水资源可持续利用研究[J]. 资源科学, 2009, 31(3): 355-360.
- [4] 毛学森, 刘昌明. 太行山山前平原地下水变化趋势与农业持续发展[J]. 水土保持研究, 2001, 8(1): 147-149.
- [5] 刘中培. 农业活动对区域地下水变化影响研究——以石家庄平原区为例[D]. 北京: 中国地质科学院, 2010.